

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Bioteekniikka

2012

Marika Kalluinen

CLOSTRIDIUM DIFFICILE: KAHDEN DIAGNOSTISEN MENETELMÄN VERTAILU



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Marika Kalluinen

CLOSTRIDIUM DIFFICILE: KAHDEN DIAGNOSTISEN MENETELMÄN VERTAILU

Clostridium difficile on anaerobi sauvabakteeri, joka muodostaa itiöitä. Osa kannoista tuottaa toksineita. *Clostridium difficile* -bakteerin tuottamat toksinit ovat suurin syy antibioottihoitoon liittyvään ripuliin ja pseudomembranoottiseen koliittiin eli paksusuolen tulehdukseen. *Clostridium difficile* -bakteerin aiheuttamaa tautia kutsutaan *Clostridium difficile* –infektioksi eli CDI:ksi. Joskus tauti voi johtaa jopa kuolemaan. Infektioita esiintyy antibiootihoidon yhteydessä iäkkäillä tai alhaisen immuunivasteen omaavilla potilailla. Sairaalahoidon lisäksi sitä esiintyy myös pitkäaikaishoidossa sekä avohoidossa olevilla potilailla. Bakteeria esiintyy maailmanlaajuisesti ja se aiheuttaa hankalia epidemioita.

Viime aikoina *C. difficile* – bakteerista on esiintynyt kantaa, joka aiheuttaa vakavampia oireita. Kantaa on esiintynyt Pohjois-Amerikassa sekä Euroopassa. Se tuottaa normaaliin kantaan verrattuna ylimäärin toksineita.

Sytotoksisuusmenetelmää on pidetty referenssimenetelmänä, mutta monet *Clostridium difficile* – bakteeria diagnosoivat laboratoriot käyttävät entsyymi-immunomenetelmiä tämän sijasta, koska ne vievät vähemmän aikaa ja ovat helpompia tehdä. Entsyymi-immunomenetelmillä on kuitenkin huonompi herkkyys ja spesifisyys kuin sytotoksisuusmenetelmällä.

Työssä verrattiin suoraan ulosteesta entsyymi-immunomentelmällä tehtävää toksininosoitusta toksinogeeniseen viljelyyn. Tavoitteena oli selvittää miten spesifinen ja herkkä suoratoksiinin osoitus on *Clostridium difficile* –bakteerin diagnostiikassa.

Suoralle toksinin osoitukselle saatiin spesifisyydeksi 97,87 % ja herkkyudeksi 76,05 % sekä positiiviseksi ennustearvoksi 88,76 % ja negatiiviseksi ennustearvoksi 94,86 %. *C. difficile* – bakteeria kantavia potilaita voi jäädä huomioimatta jos käytetään pelkästään entsyymi-immunomenetelmää. Tämä puolestaan voi johtaa vääränlaiseen hoitoon ja bakteerin leviämiseen.

ASIASANAT:

Clostridium difficile, infektio, toksini, pseudomembranoottinen koliitti, hypervirulenttikanta

Marika Kalluinen

CLOSTRIDIUM DIFFICILE: CORRELATION BETWEEN TWO DIAGNOSTIC METHODS

Clostridium difficile is an anaerobic rod which forms spores. Some of the strains produce toxins which are the most common cause for an antibiotic associated diarrhea and colitis. A *Clostridium difficile* infection (CDI) can be minor symptomatic or cause more severe pseudomembranous colitis (PMC). Sometimes an infection may lead to death. The infections are antibiotic-associated in elderly patients or patients with a low immune response. Infections also occur in long-term nursing homes and in the treatment of outpatients. The bacterium is found worldwide and causes difficult epidemics.

Recently, *C. difficile* has developed a strain which causes more severe symptoms. The strain has been encountered in North America and Europe. It produces more toxins than normal strain.

The cell cytotoxicity assay (CCA) is considered the reference test but most hospital microbiology laboratories use enzyme immunoassays (EIA) instead of CCA. EIAs exhibit lower sensitivity and specificity than cell cytotoxicity assays and they are less time consuming and easier to perform than CCA.

The PCR gene profiles of the toxigenic culture were compared with direct toxin tests by enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) from stool samples on the same day. The aim was to find out how specific and sensitive the ELFA assay is in the diagnosis of *Clostridium difficile*.

Specificity, sensitivity, the positive predictive value and the negative predictive value of the ELFA assay were 97.87 %, 76.05 %, 88.76 % and 94.86 %, respectively. If the enzyme-linked fluorescent assay is used alone, it might miss some CDI cases. This leads to insufficient treatment and spreading of the bacterium.

KEYWORDS:

Clostridium difficile, infection, toxin, pseudomembranous colitis, hypervirulent strain

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	8
2.1 <i>Clostridium</i> -suku	8
2.1.1 <i>Clostridium difficile</i>	7
2.2 Taudin kuva	7
2.2.1 Antibiootit	8
2.3 Tauti Suomessa	9
2.4 Virulenssitekijät	10
2.4.1 Toksiinien myrkyllisyys	11
2.5 Levinneisyys	12
2.6 Diagnostiset menetelmät	12
2.7 Muut menetelmät	18
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	19
4 SUORITUS	20
4.1 Viljely ja PCR	21
4.2 Vidas	24
5 AINEISTO JA MENETELMÄT	26
6 TULOKSET	29
7 LOPPUPÄÄTELMÄT	32

LIITTEET

Liite 1. Kasvatusmaljojen sisältö

Liite 2. Multiplex-PCR:n alukkeet

Liite 3. VIDAS-kitin kaivojen reaktiot ja sisältö

KUVAT

Kuva 1. PaLoc-alue.	11
Kuva 2. VIDAS-näytelalusta ja päällystetty kärki.	16
Kuva 3. Näytteen pipetointi alustan eri kaivojen läpi.	17
Kuva 4. <i>Clostridium difficile</i> pesäkkeitä CCFA-maljalla.	22
Kuva 5. <i>Clostridium difficile</i> –pesäkkeitä FAA-maljalla.	22
Kuva 6. Geeliajo näytteistä.	24

KUVIOT

Kuvio 1. Näytteiden käsittelyprosessi.	20
Kuvio 2. Viljelypositiivisten näytteiden sukupuolijakauma.	29

TAULUKOT

Taulukko 1. RFV-arvojen rajat.	17
Taulukko 2. Ristiintaulukoinnin periaate.	27
Taulukko 3. Tulokset ja näytteiden määrä.	30
Taulukko 4. Tulokset ilman raja-arvoja.	30
Taulukko 5. Tulokset mukaan lukien raja-arvot negatiivisina.	31
Taulukko 6. Tulokset mukaan lukien raja-arvot positiivisina.	31

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

<i>Clostridium difficile</i>	grampositiivinen bakteeri
Klostridit	grampositiivisten bakteerien suku
PaLoc	lyhennesanoista pathogenicity locus, patogeenisyyskohta
PCR	polymeraasiketjureaktio
CDI	<i>Clostridium difficile</i> –infektio
ELFA	entsyymi-immunomenetelmä, enzyme-linked fluorescent assay
PPV	positiivinen ennustearvo, positive predictive value
NPV	negatiivinen ennustearvo, negative predictive value
RT	huoneen lämpötila (room temperature)

1 JOHDANTO

Työ tehtiin Turun yliopiston Lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian osastolle. Työssä vertailtiin Utulab:n ja TyksLab:n diagnostiikkaa *Clostridium difficile* –bakteerin määrittämiseksi ulostenäytteestä. Utulab tarjoaa laajan tutkimusvalikoiman immunologian ja mikrobiologian alalta potilasdiagnostiikassa. Näyte tutkitaan nopeasti ja asiantuntevasti. TyksLab:iin kuuluu suurin osa Varsinais-Suomen laboratorioista. TyksLab tarjoaa terveydenhuollon laboratoriopalveluita. (1, 2)

UtuLab ja TyksLab tekevät molemmat antibioottiripuliin liittyvää *Clostridium difficile* – bakteeridiagnostiikkaa Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin alueella. TyksLab:ssa tehdään suoraan ulosteesta tehtävää toksininosoitusta ja UtuLab:ssa tehdään viljelyä, josta tehdään kannan herkkyysmääritykset sekä toksinigeenien osoitus. *Clostridium difficile* aiheuttaa antibioottihoidon yhteydessä vakavan taudin ja sitä esiintyy yleensä epidemioina sairaaloissa, mutta myös kotihoidossa infektiot ovat lisääntyneet. Laboratorioilla on erilaisia menetelmiä käytössään *C. difficile* – bakteerin diagnosointiin. UtuLab käyttää suoraan ulostenäytteistä tehtävää viljelyä, joista viljelypositiiviset näytteet jatkoanalysoidaan Multiplex-PCR:ta käyttäen. Analysointiin menee aikaa, mutta tulokset ovat luotettavat. TyksLab käyttää ELFA-menetelmään perustuvaa VIDAS-laitetta diagnosointiin. Näyte esikäsitellään ja kone mittaa *C. difficile* - bakteerin erittämien toksinien määrän ulosteesta. Menetelmä on nopea ja konetta voidaan käyttää myös muihin määritelmiin, mutta sen herkkyys on huono *Clostridium difficile* – bakteerin toksinien diagnosoinnissa. (1, 2)

Työssä verrattiin TyksLab:n suoraa toksininosoitusta Utulab:n toksinogeeniseen viljelyyn, josta seuraa toksinigeenien osoittaminen viljelystä kannasta polymeerasiketjureaktiolla. Molempien laboratorioiden tutkimustulokset käytiin läpi kolmen vuoden ajalta ja laskettiin TyksLab:n menetelmälle herkkyys ja spesifisyys sekä ennustearvot. Saaduista tuloksista voidaan päätellä, miten hyvä ja luotettava TyksLab:n menetelmä on.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Clostridium*-suku

Clostridium-suvun bakteerit ovat anaerobeja sauvabakteereita, joista useimmat muodostavat itiöitä. Itiöinnin vuoksi ne kestävät vaativia olosuhteita ja pystyvät leviämään ympäristöönsä. Klostridit kuuluvat ihmisen suoliston normaaliflooraan. Niitä on myös muissa ympäristöissä kuten maaperässä, jätevesissä ja vesistöissä. *Clostridium*-sukuun kuuluu yli 200 lajia. Yleisesti klostridit ovat grampositiivisesti värjäytyviä, mutta on myös lajeja, jotka ovat gramnegatiivisia poiketen soluseinän rakenteesta. Sukuun kuuluu myös ei-itiöiviä bakteereja sekä kokkeja ja aerobisia lajeja. (3)

Ihmistä infektoivia *Clostridium*-lajeja tunnetaan nykyisin vain muutama. Infektion yhteydessä klostridit saavat suotuiset elinolosuhteet, kun muut aerobiset bakteerit käyttävät hapen ja tuottavat klostrideille ravinteita ympäristöön. Klostridit erittävät elinympäristöönsä toksineja, jotka aiheuttavat infektion. Vakavat tulehdukset voivat johtaa jopa kuolemaan. (3)

Ruokamyrkytystä aiheuttaa *Clostridium perfringens*, joka saa suotuisat kasvuolosuhteet, kun ruoka on kypsennetty huolimattomasti ja uudelleen kuumennettu. Itiöt selviävät hengissä valmistuksen aikana ja hitaassa jäähdytyksessä ne alkavat lisääntymään. Ohutsuoleen päästessään bakteerit tuottavat enterotoksiinia ja ripulitauti alkaa 7-30 tunnin kuluessa. *C. perfringens* voi aiheuttaa myös kudosnekroosia eli esimerkiksi myonekroosia eli lihaskuoliota. (3)

Clostridium botulinum aiheuttaa myös ruokamyrkytystä ja tästä johtuvaa tautia, botulismia. Myrkytyksen lähteenä on yleensä ruoka, johon on erittynyt bakteerista toksiniä kuten tyhjiöpakatuissa kaloissa tai kotisäilykkeissä. *C. botulinum* –bakteerin itiöt kestävät kuumentamisen, mutta myrkytty tuhoutuu

100 °C:ssa 10 minuutissa. Botulismi aiheuttaa muun muassa väsymystä ja huimausta ja myöhemmin neurologisia oireita ja halvauksen. (3)

Jäykkäkouristusta aiheuttaa *Clostridium tetani*. Jäykkäkouristus tulee, kun haava kohtaan pääsee likaa. Etenkin syvissä haavoissa anaerobit mikrobit pääsevät kasvamaan. *C. tetani* –bakteeria esiintyy maaperässä, eläinten suolistoissa sekä se kuuluu ihmisen normaaliflooraan. Anaerobiset olosuhteet haavassa saavat bakteerin kasvamaan ja tuottamaan itiöitä sekä neurotoksiinia eli tetanospasmiinia. Neurotoksiini leviää haavasta verenkiertoon ja aiheuttaa halvauksia ja lihaksiston kouristuksia. Jäykkäkouristusta estetään rokottamalla. (3)

2.1.1 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile on anaerobi, itiöitä muodostava, grampositiivinen sauvabakteeri. Se kuvattiin ensimmäisen kerran vuonna 1935 *Bacillus difficilis* –bakteeriksi terveiden vastasyntyneiden ulosteesta. Bakteeri tunnistettiin vuonna 1977 antibioottihoitoon liittyvän koliitin yhteydessä. Nimi pohjautuu *C. difficile* –bakteerin vaikeaan viljeltävyyteen. Viljeltävyyttä hankaloittavat hidas kasvu verrattuna muihin *Clostridium*-suvun lajeihin. Bakteeri on myös erittäin happiherkkä kasvun logaritmisessa vaiheessa, jolloin vegetatiivisolut vallitsevat kasvua. (4)

2.2 Taudin kuva

Clostridium difficile -tauti leviää kosketuksen kautta potilaalta, hoitohenkilökunnalta tai ympäristön kautta toiseen potilaaseen. *C. difficile* –bakteerin itiöt pääsevät ihmiseen suun kautta ja näin päätyvät suolistoon. Terveellä ihmisellä bakteeri ei aiheuta tautia, mutta antibioottihoiton yhteydessä *C. difficile* –bakteeri pääsee valloilleen suolistossa. (5)

Clostridium difficile aiheuttaa antibioottihoiton yhteydessä ripulitautia. Terveellä ihmisellä se kuuluu suoliston normaaliflooraan, erityisesti vastasyntyneillä. Bakteerin kantajuus vähenee vanhetessa. Infektio syntyy suoliston

normaaliflooran häiriintyessä, jolloin *C. difficile* saa suotuisan elinympäristön ja alkaa lisääntyä. Bakteeri alkaa erittämään toksineja, jotka johtavat suoliston epiteelin tuhoutumiseen ja tulehtumiseen sekä suolen kolonisoitumiseen. Tautia esiintyy yleensä antibiootihoidon yhteydessä tai potilailla, joilla on heikko vastustuskyky. Potilas voi olla myös oireeton kantaja. (3)

Oireet vaihtelevat lievästä ripulista hengenvaaralliseen koliittiin, toksiseen kooloniin ja sepsikseen eli verenmyrkytykseen. Ripuli voi olla myös veristä sekä muina oireina voivat olla vatsakrampit sekä vatsan alueen arkuus. Tautia kutsutaan *Clostridium difficile* -infektioksi eli CDI:ksi (*Clostridium difficile* infection) tai CDAD:ksi (*Clostridium difficile* -associated disease). Vakavammassa CDI:ssa kehittyy vesiripuli, vatsakivut, kuume ja huonovointisuus. Taudin muuttuessa vakavampaan muotoon puhutaan paksusuolen tulehduksesta, jota kutsutaan pseudomembranoottiseksi koliitiksi eli PMC:ksi (pseudomembranous colitis). PMC voi johtaa suolen puhkeamiseen. (6)

Pseudomembranoottisessa koliitissa suolen seinämiin muodostuu vaalean kellertäviä plakkeja, joiden yhteen muodostumaa kutsutaan pseudomembraaniksi. Näitä syntyy, kun suoliston solut alkavat tuhoutua *C. difficile* –bakteerin erittämien toksiinien toimesta. Ennen luultiin toksiinien A ja B toimivan yhdessä, mutta nykyään on myös tapauksia joissa pelkästään toksini B on aiheuttanut taudin. (3)

Riskiryhmän muodostavat vanhukset (yli 65-vuotiaat) sekä alhaisen immuunivasteen omaavat henkilöt. Tautia voi esiintyä myös ilman antibioottiloitoa, jos suolen toiminta on heikentynyt esimerkiksi leikkauksen johdosta. (3)

2.2.1 Antibiootit

Antibiootit aiheuttavat suurimman osan infektioista. *Clostridium difficile* on enenevässä määrin resistentti eräillä antibiooteille kuten fluorokinoloneille, Hoidossa tulee ottaa huomioon potilaan aikaisemmat antibiootihoidot ja

päätettäessä millä hoitomuodolla nykyistä tulehdusta olisi hyvä hoitaa. CDI:tä hoidetaan ensisijaisesti metronidatsoli-antibiootilla. Myös vankomysiinia käytetään, mutta se on kalliimpi kuin metronidatsoli sekä se voi lisätä vankomysiini-resistenttien enterokokki-bakteereiden kasvua. (6)

Saatavilla olevat antibiootit tehoavat CDI-tautiin pääasiassa vaikuttamalla itse bakteeriin eivätkä oireita aiheuttaviin toksineihin. Tämän takia on kehitteillä muitakin hoitomuotoja kuin antibioottiliikki. Yksi vaihtoehto voi olla mikrobi, jotka palauttavat tai korjaavat suoliston normaaliflooraa. Näitä ovat esimerkiksi probiootit. Ne voivat auttaa parantumaan taudista. Probiootteja on laajalti erilaisia ja ne vaikuttavat eri tavalla, mikä saattaa hankaloittaa tutkimustulosten luotettavuuden tulkintaa. Tämän takia pitäisi tutkimuksia tehdä vain tietyillä probiooteilla. Toinen mikrobeihin perustuva parannuskeino on ulosteensiirto. Muita hoitokeinoja ovat vasta-aineisiin perustuvat hoidot sekä toksineita sitovat aineet. Leikkausta pidetään viimeisenä hoitomuotona vaikeissa tapauksissa, jolloin leikkauksessa tulehtunut suoli poistetaan. (7)

Fidaksomysiini on makrosyklinen antibiootti, joka vaikuttaa *C. difficile* -bakteeriin vankomysiinia paremmin *in vitro*. Fidaksomysiini on uusi antibiootti, jolla on saatu lupaavia tuloksia *C. difficile* -bakteerin hoidossa. Tutkimuksen mukaan fidaksomysiini oli parempi hoitomuoto kuin vankomysiini. Fidaksomysiinihoidossa tutkitavat potilaat paranivat nopeammin sekä taudin uusiutuminen oli pienempää kuin vankomysiiniä saavilla potilailla. CDI:n hoidossa käytettävillä metronidatsolilla ja vankomysiinillä on haittavaikutuksensa. CDI uusiutuu molempien lääkehoitojen yhteydessä sekä nämä molemmat antibiootit saattavat lisätä tai edistää vankomysiiniresistentin enterokokin kasvua. Fidaksomysiinin edut ovat taudin uusiutumisen väheneminen, koska sen teho perustuu *C. difficile* -bakteerin tuhoutumiseen, kun taas vankomysiini estää *C. difficile* -bakteerin kasvua. (8)

2.3 Tauti Suomessa

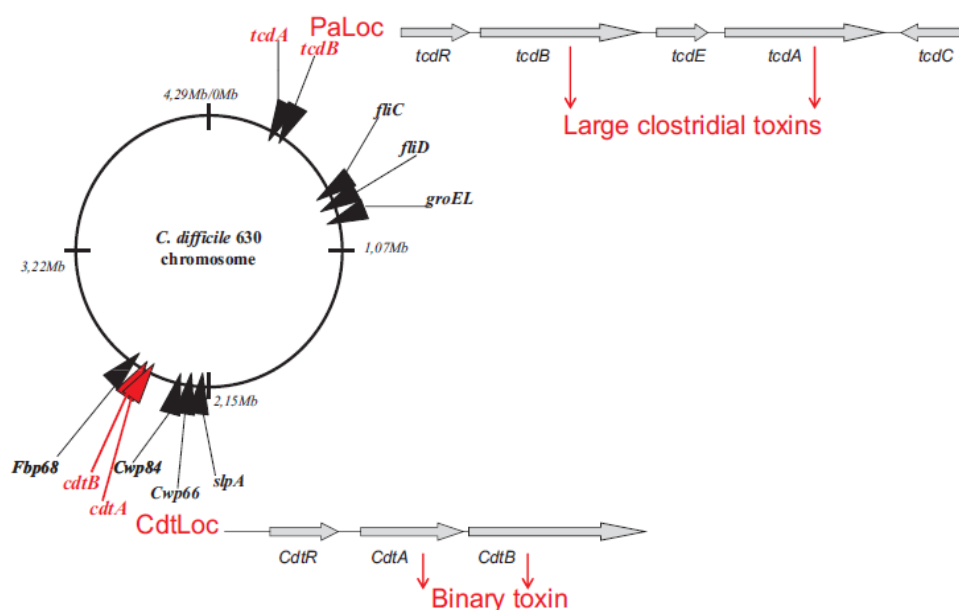
Ennen vuotta 2004 *Clostridium difficile* -infektioista oli vähän tietoa. Samana vuonna tehdyn tutkimuksen mukaan vuosina 1996 – 2004 oli 10 958

hoitoilmoitusta, jotka sopivat CDI:on. Yli puolet näistä oli yli 65-vuotiailta ja yli puolet oli naisilta. Tutkimuksen aikana sellaisten hoitoilmoitusten määrä kaksinkertaistui, joihin *C. difficile* sopii. Tutkimuksen aikana moni laboratorio siirtyi vain toksiini A:ta määrittävästä menetelmästä molempia toksiineita määrittävään menetelmään. (9)

Clostridium difficile – infektioita seurataan Suomessa Sairaalainfektio-ohjelmalla (SIRO). Se antaa tietoa ja ohjeita sairaaloille, jotka osallistuvat tähän seurantaan. Seurannalla pyritään tunnistamaan vakavat tapaukset, havaitsemaan lisääntyminen eli mahdollisten epidemioiden syntyminen, seurataan avo- ja sairaalahoitosyntyisiä infektioita ja se antaa yhtenäiset määritelmät ja menetelmät sairaaloille. Infektiot määritellään SIRO:n mukaan kolmeen kriteeriin. Ensimmäisessä on ripuliuloste tai toksinen megakoolon sekä positiivinen toksiinitesti tai toksiinia tuottavan kannan kasvu viljelmässä. Toisessa kriteerissä on todettu pseudomembranoottinen koliitti kolonoskopiassa ja kolmannessa kriteerissä *C. difficile* – infektiolle tyypillinen histopatologia kudoksenäytteessä (kudosnäyte tutkitaan mikroskoopilla). (10)

2.4 Virulenssitekijät

Clostridium difficile tuottaa kahta toksiinia, toksiini A:ta eli TcdA:ta ja toksiini B:tä eli TcdB:tä. Toksiini A on enterotoksiini ja toksiini B on sytotoksiini. Nämä primaaritoksiinit ovat koodattu *C. difficile* – bakteerissa PaLoc-alueeseen eli patogeenisyyskohtaan, joka sisältää viisi geeniä (kuva 1). Toksiinigeenejä merkitään vastaavasti *tcdA* ja *tcdB*. Toksiineja tuottamattomissa kannoissa PaLoc-alue on korvattu ei-koodaavalla, 115 emäsparin suuruisella nukleotidisekvenssillä. Toksiineja tuotetaan kasvun myöhäisessä logaritmisessa vaiheessa ja stationaarivaiheessa. Tuotto riippuu kannasta sekä ympäristön tekijöistä kuten ravinteista. (4, 11)



Kuva 1. Paloc-alue. (12)

Toksiinien tuoton säätelyä koodaavat geenit sijaitsevat myös PaLoc-alueella. *tcdR* säätelee toksiinin tuottoa positiivisesti ja *tcdC* negatiivisesti. *tcdR* säätelee toksiinin tuottoa ulos solusta. Hypervirulentilla 027-kannalla on *tcdC*-geenissä deleetio, joka on yhden emäksen suuruinen ja johtaa geenin lukukehyyksen muutokseen ja *tcdC*-säätelyproteiinin lyhyempään ja viallisempaan synteesiin kuin normaalilla kannalla. Näin ollen toksiineja erittyy solusta ylimäärin ulos, koska mikään ei rajoita niiden tuottoa. Tämä aiheuttaa vakavamman CDI:n kuin normaalisti toksiineja tuottava kanta. (4, 11)

Primaaritoksiinien lisäksi *C. difficile* – kannat voivat tuottaa binääritoksiinia. Tämä geenialue on PaLoc-alueen ulkopuolella CDT-lokuksessa. Binääritoksiini muodostuu kahdesta alayksiköstä, joita koodaavat geenit *cdtA* ja *cdtB*. (4, 11)

2.4.1 Toksiinien myrkyllisyys

TcdB toksiinia on tutkittu paljon soluviljelyissä, mutta toksiinin vaikutus *in vivo* on tuntematon. Lisäksi sen vaikutusta on vaikea tutkia eläinkokein. TcdB vaikutusta on tutkittu seeprakala-alkioissa. TcdB on potentiaalinen

solunsisäinen myrkky, jonka LD₅₀-arvo on 200 ng/kg. LD₅₀ on annos myrkkyä, joka tappaa puolet koe-eläimistä tutkimuksen aikana. TcdB on vaikuttanut soluviljelyissä solun muotoon ja johtanut ohjattuun solukuolemaan eli apoptoosiin. Se vaikuttaa lukuisiin solutyyppeihin *in vitro* esimerkiksi fibroplasteihin ja epiteelisoluihin. Ei kuitenkaan tiedetä tapahtuuko näin CDI:ssa. TcdA vaikuttaa suoliston vaurioitumiseen. On tutkittu, että TcdB vaikuttaa vain suolistovauriossa, jolloin TcdA auttaa TcdB pääsyä verenkiertoon. Tämä vahvistaa henkeä uhkaavan CDI:n lisätautien synnyn. Bakteritoksiinien vaikutuksia kohdesoluihin on vaikea määrittää, koska on vaikeaa suoraan havainnoida näiden proteiinien vaikutusta elimiin reaaliajassa. Seeprakala-alkiot ovat läpinäkyviä, mikä mahdollistaa elinten tutkimisen valomikroskoopilla. Tutkimuksessa kävi ilmi, että TcdB voi vaikuttaa sydämen toimintaan, mahdollisesti vaikuttamalla suoraan sydämen toiminnallisiin soluihin. CDI:n aiheuttamiin kuolemiin on myös liittynyt sydämenpysähdyksiä. (13)

2.5 Levinneisyys

Ensimmäinen *C. difficile* –bakteerin hypervirulentti 027-kannan havainto tehtiin Suomessa 2007. Diagnostiikan parantuessa löydösten määrä on lisääntynyt. Vuodesta 2008 lähtien *C. difficile* -bakteerin aiheuttamat infektiot on ilmoitettu tartuntatautirekisteriin. 027-kantaa on esiintynyt ensimmäisenä Pohjois-Amerikassa ja sen jälkeen Euroopassa. (14)

2.6 Diagnostiset menetelmät

Tarkat määritysmenetelmät ovat tärkeitä CDI:n diagnosoinnissa, jotta saadaan potilaille oikea hoito, vältetään taudin leviäminen ja saadaan oikeaa tietoa taudista ja bakteerista. Testien epätarkkuus rajoittaa näiden tietojen saamista. Käytettäessä menetelmiä, joiden herkkyys on alhainen, riskinä ovat väärät negatiiviset tulokset ja käytettäessä epäspesifisiä menetelmiä saadaan enemmän vääriä positiivisia tuloksia. Potilas saa näin väärää hoitoa ja hänet altistetaan mahdolliselle CDI-taudille. Herkkyiden ja spesifisyyden huonous heikentävät tuloksia ja näistä saatavaa tietoa. (15)

Yleisimmät immunomenetelmät mittaavat näytteestä toksiinipitoisuuden. Ennen oli pelkästään menetelmiä, jotka määrittivät toksiini A:ta. Myöhemmin huomattiin olevan myös kantoja, jotka erittävät pelkästään toksiini B:tä, minkä takia yleistyivät yhdistelmämenetelmät käyttöön. Tuloksiin vaikuttavat myös laboratorioolosuhteet: näytteiden käsittely, tarkka ohjeiden noudattaminen ja referenssimenetelmien puute. (15)

C. difficile on anaerobibakteeri ja näin ollen erityisen herkkä hapelle. Se tulee viljellä mahdollisemman nopeasti geelikuljetusputkesta maljalle ja kasvattamisen tulee tapahtua anaerobisissa olosuhteissa. Viljelyssä käytetään CCFA-maljaa (Cycloserine cefoxitin fructose agar). CCFA-malja sisältää antibiootteja, jotka estävät muiden bakteereiden kasvun. Alkoholikäsittely voidaan tehdä ennen viljelyä. Se tuhoaa muita bakteereita ja auttaa *C. difficile* –bakteeria itiöitymään. Alkoholikäsittelyn jälkeen näyte viljellään mieluiten CCEY-maljalle (Cefoxitin cycloserine egg yolk). Sen sisältämä koolihappo mahdollistaa itiöiden kasvamisen. Inkubointi kestää 2 vuorokautta. *C. difficile* kasvaa CCFA-maljalla kellertävänä, liekkimäisenä pesäkkeenä, jonka ominaishaju on navettamainen tai se muistuttaa hevosenselän hajua. CCEY-maljalla pesäkkeet ovat harmahtavia tai valkoisia. Jatkotutkimuksena maljalta voidaan tehdä antibioottilherkkyydet, yleisimmin metronidatsolille ja vankomysiinille, koska kannat ovat yleensä herkkiä näille antibiooteille. Antibioottilherkkyysmaljalle laitetaan antibioottinapit. Antibiootille sensitiivinen kanta muodostaa napin ympärille estorenaan. Resistenttikanta kasvaa antibioottinappiin kiinni. Toksiinin tuottoa ei voida havaita maljalta vaan on tehtävä jatkotutkimus. Toksiinipitoisuus voidaan mitata suoraan näytteestä tai toksiinigeeni voidaan määrittää PCR-menetelmällä. (11)

Entsyymi-immunomenetelmät (EIA, enzyme immunoassays) ovat yleisimpiä menetelmiä *Clostridium difficile* –bakteerin diagnostiikassa, vaikka niillä on huono herkkyys. Ne ovat nopeita ja helppoja menetelmiä laboratorioille. Huonon herkkyys takia EIA-menetelmiä ei saisi käyttää yksinään testausmenetelminä, jos vaaditaan jatkuvaa diagnosointia. EIA:n kanssa pitäisi

käyttää toista referenssimenetelmää, jolla on parempi herkkyys kuin EIA-menetelmällä. (16)

C. difficile –bakteerin aiheuttaman ripulin diagnostiikassa tärkeimmät asiat ovat nopeus ja luotettavuus. Suora toksiininosoitus voidaan tehdä suoraan ulostenäytteestä ja vastaus saadaan parissa tunnissa, jollei jopa kymmenissä minuuteissa toisin kuin viljely, jonka suoritus kestää pari vuorokautta. Toksiininosoitus voidaan tehdä kaupallisella kitillä EIA-menetelmään perustuen. Näillä menetelmillä on kuitenkin huono herkkyys, jota voidaan nostaa ottamalla perättäisiä näytteitä samalta potilaalta. (11)

Suomessa tehtiin vuonna 2006 tutkimus laboratoriomenetelmistä *C. difficile* – diagnostiikassa. Tutkimukseen vastasi 28 laboratoriota, joista 4 ei tee *C. difficile* – diagnostiikkaa. 24 laboratoriota 21 (88%) teki toksiininosoitusta ja 19 (79 %) viljelyä. Viljely ja toksiininosoitus olivat yhdistelmämenetelmänä 16 (67 %) laboratoriossa ja pelkkä toksiininosoitus ulosteesta 5 (21 %) laboratoriossa. 3 (13 %) laboratoriota teki pelkästään viljelyä. Laboratoriot käyttivät toksiininosoitukseen kaupallisia kittejä sekä yksi laboratorio PCR-menetelmää. (14)

Sytotoksisuusmenetelmässä (CYT, cytotoxin assay) mitataan toksiinipitoisuus ulostenäytteestä valmistetusta supernatantista. Menetelmä on yleisesti käytetty referenssilaboratorioissa ja sitä pidetään eräänä referenssimenetelmänä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää sytotoksisuusviljelyä (CYTGC, cytotoxogenic culture), joka tehdään suoraan näytteestä. Nämä menetelmät ovat pitkiä, 24 tunnista 48 tuntiin. Menetelmät vaativat solulinjan säilyttämisen näytteiden analysointia varten. (17)

PCR-menetelmällä pystytään kartoittamaan *C. difficile* -bakteerin toksiinigeenit. Geenialueet voivat muuttua ajan kuluessa mutaatioiden seurauksena, mikä voi johtaa toksiinintuoton muuttumiseen. PCR-menetelmä voidaan tehdä normaaleissa laboratorio-olosuhteissa ja menetelmällä nähdään bakteerin PaLoc-alueen geenit. Nämä geenit on määritetty eri kannoista, jotta on saatu tietoa eri kantojen mutaatioista. PCR-menetelmässä käytetään alukkeita, joiden avulla on helppo todeta mahdolliset mutaatiot. (11)

Multiplex-PCR:lla (polymeraasiketjureaktio, jossa samassa reaktiossa monistetaan useita geenejä) osoitetaan *Clostridium difficile* -kannoista tärkeimmät geenit ja niiden muutokset, jotka voivat aiheuttaa taudin. Näitä ovat Paloc-alueen geenit *tcdA* ja *tcdB* ja CDT-alueen binääritoksiinituoton geenit *cdtA* ja *cdtB*. Multiplex-PCR mahdollistaa näiden kaikkien geenien monistamisen yhdellä kertaa, kun tavallinen PCR monistaa kerrallaan vain yhtä geeniä. Monistamisessa käytetään kontrolleina *C. difficile* -kanta VPI 10463 eli ATCC 43255, jonka Paloc-alueen rakenne ja sekvenssi tunnetaan, sekä *C. difficile* -kanta numero 5227, joka on ribotyypiltään 027. Kanta 5227 on UtuLab:n potilaskanta. (18)

Tutkimusten mukaan multiplex-PCR vastaa täysin PCR-ribotyypitystä. Näin ollen multiplex-PCR:ta voidaan harkita yhdeksi referenssimenetelmäksi *Clostridium difficile* -diagnostiikassa. Geenimääritys on käytännöllinen, jotta tiedetään bakteerin patogeenisuus. Multiplex-PCR ei vaadi puhdasta bakteeriviljelmää eivätkä muut bakteerit häiritse multiplex-PCR:n toimintaa. Muut menetelmät esimerkiksi PCR-ribotyypitys sekä PFGE tarvitsevat täysin puhtaan näytteen onnistuakseen. Multiplex-PCR:lla voidaan korvata antigeenitesti jos laboratorio pystyy tekemään geeliajon samana päivänä kuin positiivinen viljelytulos on saatu. Uudet menetelmät tulisivat validoida referenssimenetelmillä. On huomattavaa, että kaikilla kannoilla ei ole 18 emäsparin deleetiota kuten kontrollikannalla 027. Kuitenkin on tutkittu, että 027-kannalla on samat piirteet multiplex-PCR:lla kun PCR-ribotyypitykselläkin. Multiplex-PCR määrittää tyydyttävästi hypervirulentit *C. difficile* – kannat. Multiplex-PCR myös määrittää mahdolliset muut kannat, joissa on suuri *tcdC*-deleetio. Tämä aiheuttaa *C. difficile* –bakteerin kannan mutaation. (18)

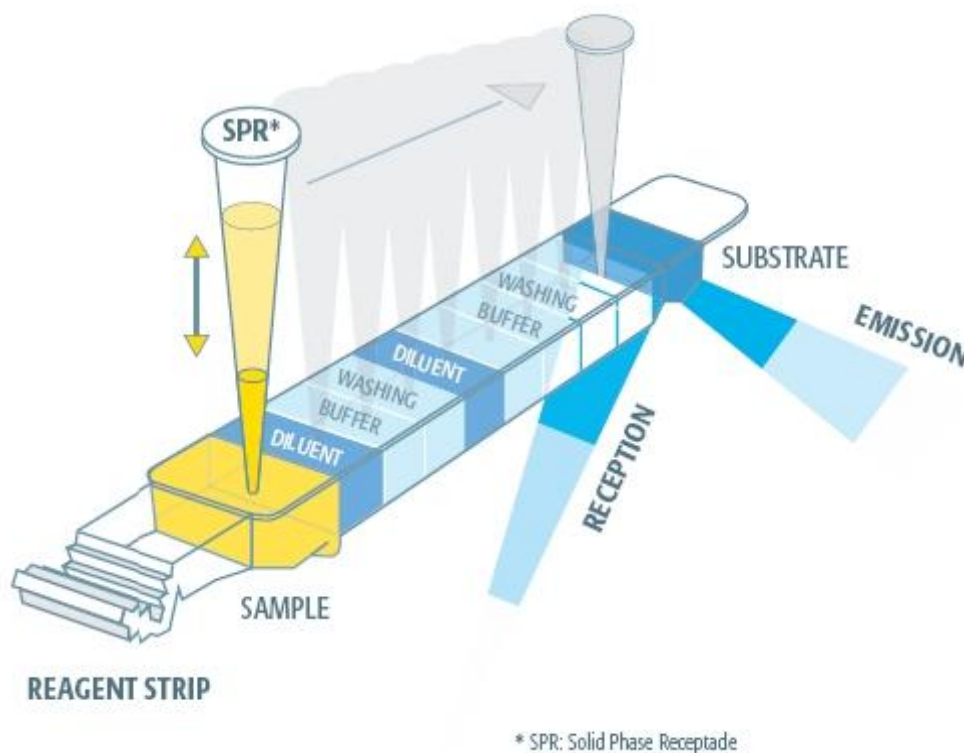
Vidas-laite käyttää kaksivaiheista entsyymi-immunomenetelmää eli ELFA-menetelmää (enzyme immunoassay sandwich method with a final fluorescent detection). Vidas-laitetta varten on reagenssikitti, jossa on pipetointialusta ja koutattu eli päällystetty pipetin kärki (kuva 2). Alustassa on toksiinien määrittämiseen tarvittavat reagenssit valmiina, samoin myös pipetin kärjessä. Näyte valmistellaan ja laitetaan reagenssikitin alustan avonaiseen kaivoon.

Alusta asetetaan Vidas-laitteeseen kuten myös pipetinkärki omaan osaansa. Laite pipetoi näytteen päällystetyn kärjen kautta eri alustan kaivoihin, jolloin tapahtuu alkaalinen fosfataasi ja näyte fluoresoi sinisenä, jolloin saadaan mitattua toksiinipitoisuus näytteestä. (19)



Kuva 2. VIDAS näytekaivot ja pipetin kärki. (20)

Menetelmään kuuluu neljä reaktiota, jotka on automatisoitu. Reaktiomediumia kierrätetään alustan kaivoissa ja pipetin kärjessä. Jokaista vaihetta seuraa pesuvaihe, joka poistaa sitoutumattomat komponentit. Neljässä reaktiossa tapahtuu seuraavaa: näytteen toksiineiden A ja B spesifinen sitoutuminen toksiineiden vasta-aineisiin pipetinkärjessä, biotiinin konjugoima sitoutuminen toksiineiden ja vasta-aineiden välillä, inkubointi streptavidiinin konjukoidussa alkaalisessa fosfataasissa, detektio tapahtuu alkaalisen fosfataasin katalysoidessa substraatin hydrolyysia fluoresoivaksi tuotteeksi ja fluoresenssi mitataan aallonpituudella 450 nm. Fluoresenssin määrä lisääntyy mitä enemmän näytteessä on toksiineita (kuva 3). (19)



Kuva 3. Näytteen pipetointi alustan eri kaivojen läpi. (20)

Fluoresenssi mitataan kahdesti: ensimmäiseksi mitataan tausta ennen substraatin lisäystä ja toinen mittaus tapahtuu inkuboinnin jälkeen. Mitattava RFV eli suhteellinen fluoresenssiarvo (relative fluorescent value) saadaan jakamalla potilaan näytteen antama arvo standardiarvolla. Arvojen rajat ovat taulukossa 1. (19)

Taulukko 1. RFV-arvojen rajat.

Testiarvo	Vastaus
< 0.13	negatiivinen
0.13 < 0,37	raja-arvo
≥0.37	positiivinen

2.7 Muut menetelmät

C. difficile luokitellaan toksinotyyppityksessä sen PaLoc-alueen mukaan. PaLoc-alue monistetaan eri PCR:lla, minkä jälkeen tuotteet pilkotaan restriktioentsyymeillä. Tuotteet analysoidaan geelielektroforeesilla. Tällä tavoin on saatu paljon tietoa PaLoc-alueesta. Menetelmä on hidas ja työläs. (11)

PCR-ribotyyppitys perustuu RNA-molekyylejä koodaavien geenien välisen alueen monistamiseen spesifisillä RNA-alukkeilla. PCR:lla monistetaan tämä alue, jolloin saadaan eripituisia DNA-molekyylejä, jotka määritetään geelielektroforeesilla. Elektroforeesilla saatu DNA-molekyylien profiili on kannan ribotyyppi. (11)

USAssa ja Kanadassa käytetään pulssikenttäelektroforeesia eli PFGE. Elektroforeesilla erotetaan isot kromosomaaliset DNA-palat. PFGE erottaa kannat paremmin kuin PCR-ribotyyppitys ja näin sitä voidaan käyttää paikallisten epidemioiden selvittämiseen. (11)

Restriktioendonukleaasi eli REA perustuu myös DNA:ta pilkkovien entsyymien ja elektroforeesin käyttöön. Menetelmä on nopea, mutta eri laboratorioiden REA-tuloksia on vaikea verrata keskenään, koska sen toistettavuus on huono. (11)

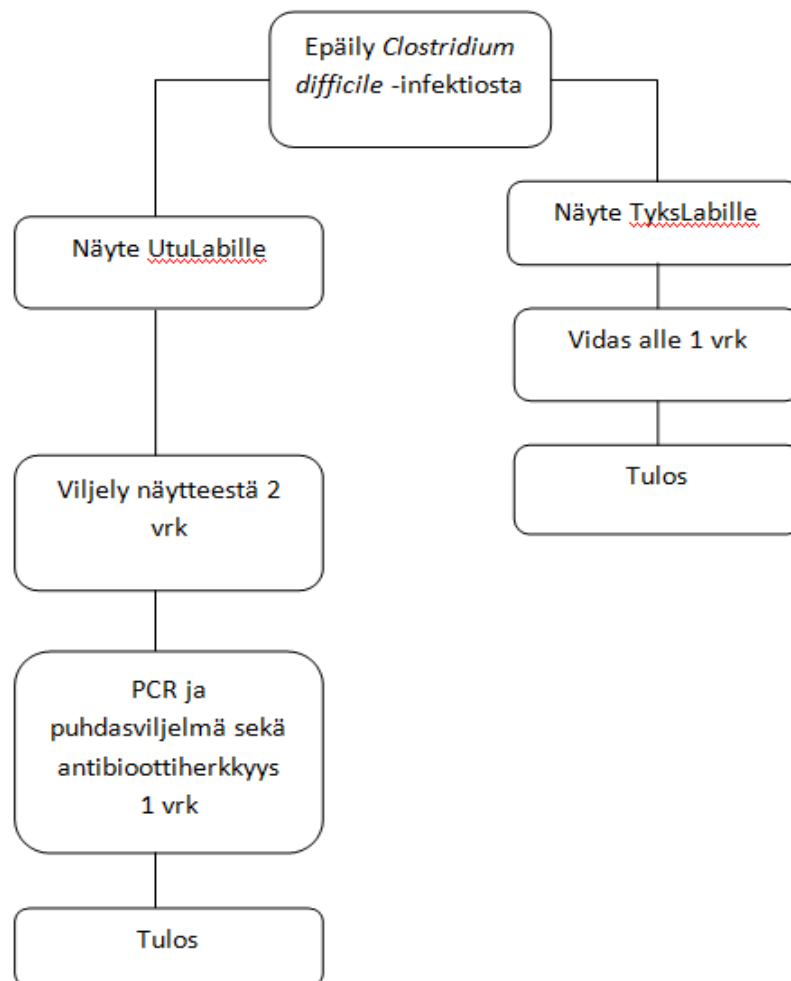
MLVA-analyysi (multilocus variable number tandem repeat) on tyyppitys menetelmistä uusin. Se perustuu bakteerin toistosekvenssien määrittämiseen PCR:lla ja geelielektroforeesilla tai sekvensoinnin avulla. Tuloksia on helppo vertailla eri laboratorioiden kesken, koska vastaukset saadaan numeroina. (11)

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Opinnäytetyössä verrattiin viljelypositiivisista *Clostridium difficile* – näytteistä tehtyä PCR:n tulosta kaupalliseen menetelmään, joka perustuu näytteen toksiinipitoisuuden mittaamiseen ELFA-menetelmällä. Kaupalliset testit ovat yleensä nopeampia kuin viljely ja positiivisesta viljelytuloksesta tehty bakteerin geeniprofiilin määrittäminen. Kaupallisten testien spesifisyys on hyvä, mutta herkkyys huono. Tavoitteena oli tutkia ovatko viljelyissä kasvaneissa *Clostridium difficile* – kannoissa toksiineja erittävä ominaisuus ja miten tämä tulos korreloituu suoran toksiininosoituksen kanssa.

4 SUORITUS

Viljelyä ja PCR-monistusta tehdään UtuLab:sa. Suora toksinin osoitus Vidas -laitteella tehdään TyksLab:n mikrobiologian laboratoriossa.



Kuvio 1. Näytteiden käsittelyprosessi.

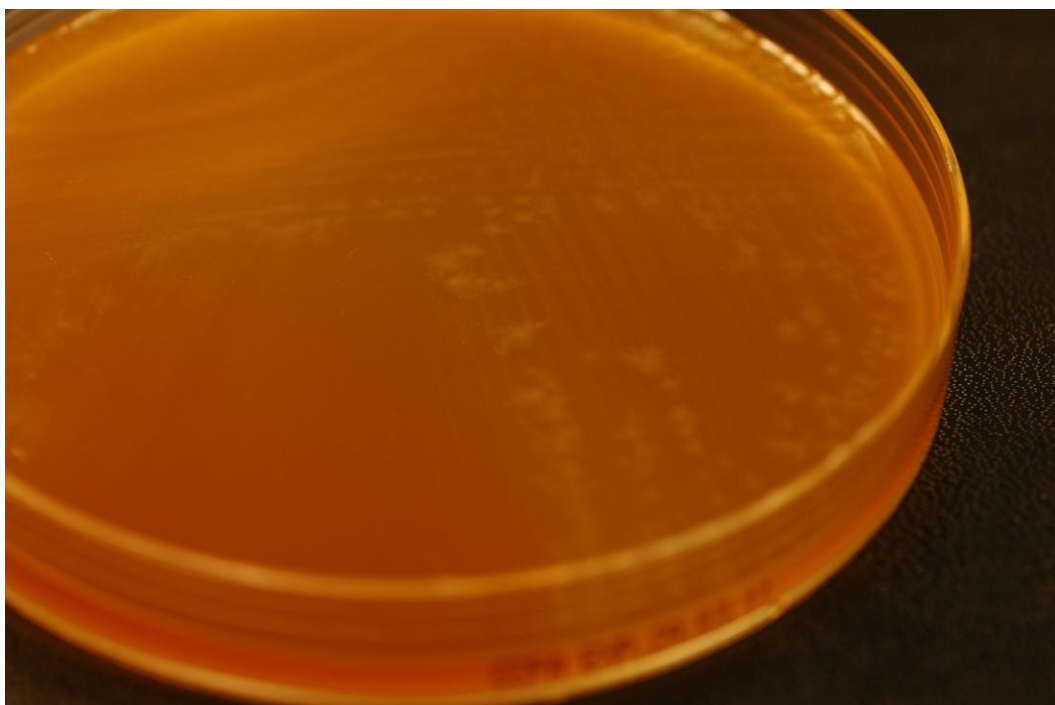
Kuvio 1 kuvaa näytteiden analysointia. Lääkäri voi tehdä lähetteen joko TyksLab:lle tai UtuLab:lle tai molemmille. UtuLab:n analysointi kestää minimissään 3 vuorokautta ja TyksLab:lla tulos voidaan saada jopa samana

päivänä. Tulosten saatiin vaikuttaa näytemäärät sekä viikonloput, jolloin analysointia ei tehdä.

4.1 Viljely ja PCR

Laboratorioon tulevat näytteet viljeltiin suoraan kuljetusputkesta elatusainemaljoille. CCFA-malja on *Clostridium difficile* -bakteerille spesifinen. Näyte levitettiin kuljetusputken pumpulipuikolla suoraan maljalle niin, että näytettä on maljan pinta-alasta 1/3. Näyte hajotettiin tämän jälkeen kahteen osaan viljelysauvalla. Näytteitä inkuboitin anaerobipöntössä kaksi vuorokautta 37 °C:ssa.

Clostridium difficile kasvaa CCFA-maljalla keltaisena, epäsymmetrisenä pesäkkeenä. Sen reunat ovat liekkimäiset ja kasvuston ominaishaju on hevostallimainen (kuva 4). Positiivisesta viljelystä tehtiin jatkoviljely. Yhdestä pesäkkeestä tehtiin puhdasviljelmä koskettamalla pesäkettä puutikulla. Puutikulla vedettiin kolme viivaa FAA-maljalle (factitious Anaerobe Agar, FAA, anaerobi verimalja) ja hajotettiin kahteen (kuva 5). Toiselle FAA-maljalle tehtiin antibioottiherkkyys. Herkkyysmalja hajotettiin täyteen ja lisättiin antibiootit: moksiflokasiini, erytromysiini, metronidatsoli ja vankomysiini. Liitteessä 1 ovat maljojen reagenssit. Jatkoviljelymaljoja inkuboitin seuraavaan päivään anaerobisesti. Samasta *C. difficile* -pesäkkeestä tehtiin myös gramvärjäys. Pesäkettä hierottiin puutikulla preparaattilasille ja näyte kiinnitettiin. Tutkittiin valomikroskoopilla 100-kertaisella suurennoksella oliko näytteessä tyypillisen näköistä grampositiivista sauvabakteeria. Grampositiivisesti värjäytyneestä näytteestä tehtiin PCR suoraan CCFA-maljan pesäkkeestä.



Kuva 4. *Clostridium difficile* – pesäkkeitä CCFA-maljalla. (21)

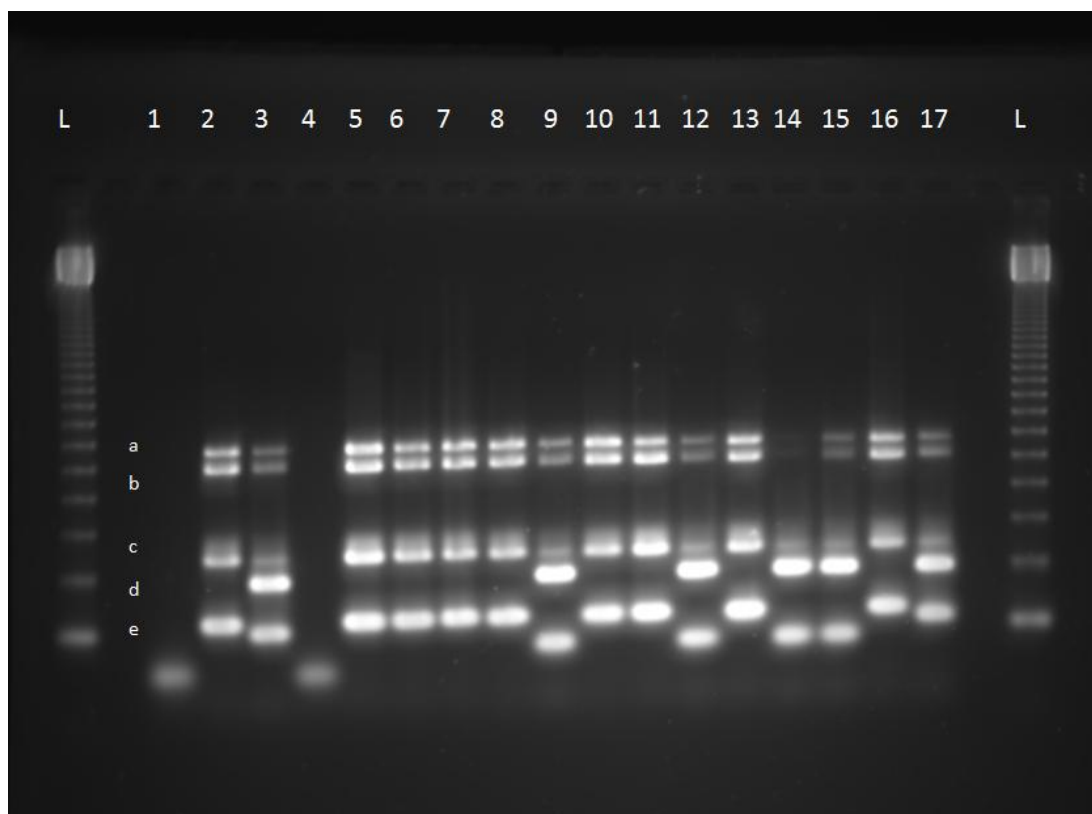


Kuva 5. *Clostridium difficile* – pesäkkeitä FAA-maljalla. (21)

Chelex 100:sta tehdään 5 % suspensio steriloituun milli-q-veteen aseptisesti. Chelex sisältää partikkeleita, joten pipetoitaessa suspensiota sekoitettiin joka välissä. Suspensiota pipetoitiin kierrekorkilliseen Eppendorf-putkeen 1 ml. Negatiivinen näyte valmistettiin pelkästä Chelex-suspensiosta. Maljalta otettiin 2 µl:n viljelysilmukalla pesäkettä Eppendorf-putkeen, muu bakteerikasvusto ei haittaa eristystä. Vorteksoitiin näytteet ja inkuboitiin 100 °C:n lämpöblokkissa 30 minuuttia. Näytteitä sentrifugoitiin 12 minuuttia 10 900 rpm RT:ssa, jonka jälkeen tehtiin master-mix kaikkiin reaktioihin. Master-mix sisältää DNA-polymeraasin, polymeraasin puskurin ja magnesiumkloridin, alukkeet, nukleotidit ja veden. Yhden reaktion tilavuus on 45 µl, johon lisättiin templaatteja 5 µl. PCR-reaktioseosta ja näytettä pipetoitiin Eppendorf-putkeen, joita on tutkittavat näytteet, negatiivinen kontrolli ja kaksi positiivista kontrollia. Siirrettiin 600 µl supernatanttia uuteen Eppendorf-putkeen ja mitattiin DNA-pitoisuus. Alukkeet ovat liitteessä 2.

PCR koostuu neljästä eri vaiheesta. Ensimmäiseksi polymeraasi aktivoitui 94 °C:ssa 10 minuuttia. Tätä seurasi denaturaatio, ja annealing, sitoutumisvaihe sekä pidennys-syklejä 35–40 kappaletta. Denaturaatio kesti 30 sekuntia 94 °C:ssa, annealing 56 °C:ssa 30 sekuntia ja pidennys 72 °C:ssa 90 sekuntia.

Geeli ajettiin 1xTBE-puskurissa 99 V:n jännitteellä. Ajo kesti kaksi tuntia, jonka jälkeen geeli värjättiin etidiumbromidi-vesiliuoksessa 20 minuuttia. Geeli pestiin vedellä 10 minuuttia. Geeli valokuvattiin UV-valon alla ja kuva tulostettiin. Kuvaan merkittiin näytteet, päivämäärä ja PCR- ja ajo-olosuhteet.



Kuva 6. Geeliajo näytteistä.

Kuva 6 on geeliajosta. Vasemmalla ja oikealla ovat kokostandardi. Näytekuja 1:ssä on negatiivinen PCR-kontrolli. Kontrollikannat *C. difficile* VPI –kannasta ovat näytekujilla 2 ja 16, ja ribotyyppi 027 näytekujilla 3 ja 17. Negatiivinen PCR-kontrolli näytekujalla 4. Näytteet ovat kujilla 5 – 15. Kohdassa a on *cdu-2* vyöhyke. Tämän alapuolella, kohdassa b, on *tcdA* ja kohdassa c *tcdB*. Seuraavaksi kohdassa d on binääritoksiinia tuottava geeni *cdtB*. Tämän alapuolella negatiivisesti toksiinituottoa säätelevägeeni alue *tcdC* kohdassa e. *tcdC*:n suuremmat deleetiot sijoittuvat alemmas kuin normaalikokoinen *tcdC*.

4.2 Vidas

Näyte otettiin ulostepurkkiin. Purkin tulee olla tiivis, puhdas sekä ilman kiinnikkeitä (fiksatiivia). Näyte voi olla kiinteää tai nestemäinen uloste, jolloin näytemääräksi riittää 3-5 ml:a. Näytteitä säilytettiin +4 °C:ssa 3 vuorokautta.

Menetelmänä käytettiin ELFA:ta, jolla todettiin A- ja B-toksiinit. Menetelmää tehtiin päivittäin. Rasvainen uloste voi johtaa väärään tulokseen. (14)

Suoratoksiinin osoitus tehtiin suoraan ulostenäytteestä. Näytettä tarvittiin 3-5 ml:a. Määrä vaihteli ulosteen koostumuksen mukaan. 200 µl ulostetta laimennettiin puskuriin eppendorf-putkessa ja vorteksoitiin. Sentrifugoitiin 2 000 x g 15 min. Testialustaan pipetoitiin 300 µl supernatanttia. Alustan kaivojen sisältö on liitteessä 3. Aloitettiin ajo joka kesti noin tunnin. Ajon loputtua kone tulosti vastaukset.

5 AINEISTO JA MENETELMÄT

Aineisto kerättiin UtuLab:n positiivisista viljelytuloksista, joita verrattiin TyksLab:n suoran toksininosoituksen vastaaviin tuloksiin (positiiviset, negatiiviset sekä raja-arvot). Vertailuun otettiin kultakin potilaalta näyte, josta oli tehty molemmat tutkimukset. Jos tutkimukset oli pyydetty erikseen ja niitä varten oli erilliset näytteet, niin vertailuun valittiin samana päivänä otetut näytteet. TyksLab:n vastaukset käytiin läpi manuaalisesti, koska muilla tavoilla se ei ollut mahdollista. Aineisto kerättiin kolmen vuoden ajalta vuosilta 2008–2010. Vuonna 2008 *C. difficile* –bakteeria alettiin tutkia multiplex-PCR-menetelmällä ja samana vuonna puhkesi *C. difficile* –bakteerin aiheuttamia epidemioita sairaaloissa.

UtuLab:n vastaukset oli kerätty Excel-taulukkoon, joista käytiin läpi vastaavat TyksLab:n tulokset. Negatiiviset TyksLab:n tulokset kirjattiin paperille ja positiiviset edellä mainittuun Excel-taulukkoon.

Tuloksista laskettiin TyksLab:n menetelmälle spesifisyys ja herkkyys sekä positiivinen ja negatiivinen ennustearvo. Tulokset käsiteltiin ristiintaulukoimalla, jossa otettiin huomioon oikeat positiiviset ja negatiiviset tulokset sekä väärät positiiviset ja negatiiviset tulokset. Näistä laskettiin menetelmälle spesifisyys sekä herkkyys. Ristiintaulukoinnissa saatiin selville mahdollisten virhetulosten todennäköisyys.

Taulukossa 2 on ristiintaulukoinnin periaate. Taulukon vasemmalla puolella on testattava menetelmä eli suora toksininosoitus ja yläosassa menetelmä, johon verrataan eli toksinogeeninen viljely ja PCR.

Taulukko 2. Ristiintaulukoinnin periaate. Punaisella ovat oikeat positiiviset tulokset, vihreällä ovat väärät negatiiviset tulokset, sinisellä ovat väärät positiiviset tulokset ja oranssilla ovat oikeat negatiiviset tulokset. Raja-arvot ovat harmaalla.

	Viljely ja PCR (vertailumenetelmä)			
		PCR toksiinipositiivinen tulos	PCR toksiininegatiivinen tulos	viljelyn negatiivinen tulos
Suoratoksiinino- soitus/Vidas (tutkittava menetelmä)	positiivinen tulos	Oikeat positiiviset	Oikeat positiiviset	Väärät positiiviset
	negatiivinen tulos	Väärät negatiiviset	Väärät negatiiviset	Oikeat negatiiviset
	raja-arvo	Oikea positiivinen/väärä negatiivinen	Oikea positiivinen/väärä negatiivinen	väärä positiivinen/oikea negatiivinen

Oikeiksi positiivisiksi tuloksiksi lasketaan ne, jotka ovat antaneet viljelyssä ja PCR:ssä positiivisen tuloksen sekä suoralla toksiininosoituksella positiivisen tuloksen. Väärät positiiviset ovat olleen negatiivisia viljelyssä sekä PCR:ssa, mutta suoratoksiinin osoitus on ollut positiivinen. Väärät negatiiviset ovat viljely- ja PCR-positiivisia, mutta suoratoksiinin osoitus on ollut negatiivinen. Oikeat negatiiviset ovat molemmissa menetelmissä negatiivisiksi saatuja tuloksia.

Taulukossa 2 suoralla toksiininosoituksella saadut tulokset merkitään riveille ja viljelyn ja PCR:n tulokset sarakkeille. Näin ollen molempien menetelmien positiiviset tulokset tulevat vasemmalle yläkulmaan (punainen) ja oikeat negatiiviset tulokset oikealle alakulmaan (oranssi). Viljelyssä ja PCR:lla saadut negatiiviset tulokset, mutta suorassa toksiininosoituksessa tullut positiivinen tulos on oikealla ylhäällä (sininen). Viljelyssä ja PCR:ssa positiivinen tulos, mutta suorassa toksiininosoituksessa tullut negatiivinen tulos on alhaalla vasemmalla (vihreä). Alarivillä ovat suoran toksiininosoituksen raja-arvotulokset, joista ei tiedetä ovatko ne lähempänä positiivista vai negatiivista tulosta.

Sensitiivisyys eli herkkyys lasketaan vertaamalla kaikkia positiivisia tuloksia koko tutkittuun tulosten määrään. Herkkyys kertoo, että millä todennäköisyydellä tautia sairastavalla on menetelmän mukaan tauti eli antaako menetelmä oikean positiivisen vastauksen.

$$\text{Sensitiivisyys} = \text{oikeat positiiviset} / (\text{oikeat positiiviset} + \text{väärät negatiiviset})$$

Spesifisyydellä tarkoitetaan, sitä miten usein menetelmä antaa negatiivisen vastauksen jos potilaalla ei ole tautia. Korkean spesifisyyden omaavan menetelmän antama tulos on lähes aina tarkka. Tällaisella menetelmällä voidaan olla varmoja, että positiivisen tuloksen saaneilla potilailla on tauti. Spesifisyys kuvaa miten hyvin menetelmällä tunnistetaan sairastuneet.

$$\text{Spesifisyys} = \text{oikeat negatiiviset} / (\text{oikeat negatiiviset} + \text{väärät positiiviset})$$

Spesifisyys ja herkkyys eivät ota huomioon taudin esiintymistä kohderyhmässä. Positiivinen ja negatiivinen ennustearvo lasketaan kuvaamaan esiintymistä. Positiivinen ennustearvo (positive predictive value, PPV) ilmaisee miten usein positiivinen löydös ilmaantuu, eli jos tulos on positiivinen, niin millä todennäköisyydellä potilaalla on sairaus. Testijoukolla, jolla on pieni mahdollisuus sairastaa tautia, täytyy tuloksien olla vapaita vääristä positiivisista vastauksista eli spesifisyyden täytyy olla 100 %. Alhainen positiivinen ennustearvo on yhteydessä potilaisiin, joiden hoitaminen ei ole ollut välttämätöntä. Negatiivinen ennustearvo (negative predictive value, NPV) ilmentää oikeiden negatiivisten tulosten osuutta menetelmän annettua negatiivinen tulos. Alhainen negatiivinen ennustearvo ilmentää, että monet tautia kantavat jäävät huomioimatta. (22)

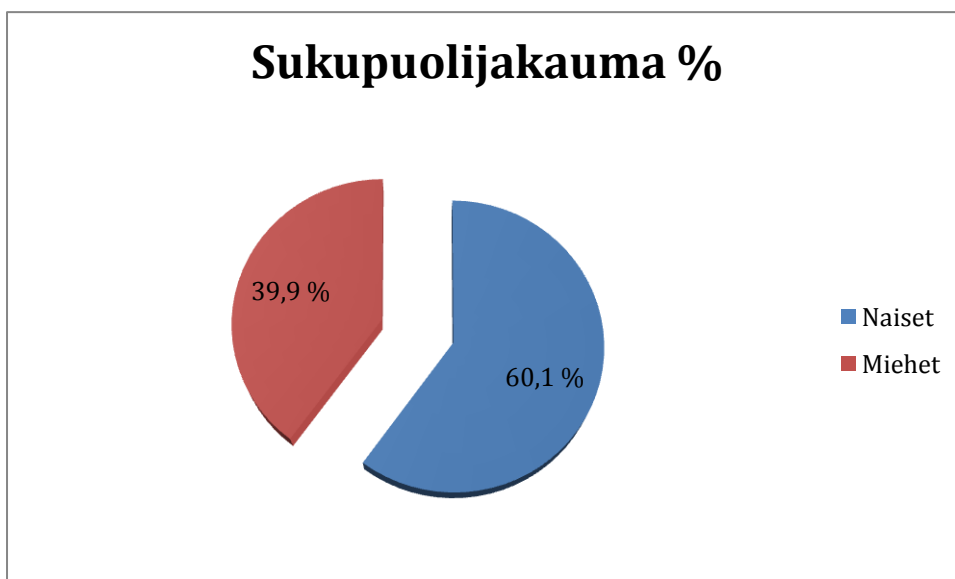
$$\text{Positiivinen ennustearvo} = \text{oikeat positiiviset} / (\text{oikeat positiiviset} + \text{väärät positiiviset})$$

$$\text{Negatiivinen ennustearvo} = \text{oikeat negatiiviset} / (\text{oikeat negatiiviset} + \text{väärät negatiiviset})$$

6 TULOKSET

11 073 näytteestä tehtiin ristiintaulukointi, jonka avulla laskettiin tutkimuksen sensitiivisyys eli herkkyys ja spesifisyys eli tarkkuus sekä positiivinen että negatiivinen ennustearvo.

Kaikista näytteistä 2 250 näytettä oli viljelypositiivisia. Näistä näytteistä 60,1 % oli naisilta (1352 kpl) ja miehiltä 39,9 % (898 kpl).



Kuvio 2. Viljelypositiivisten näytteiden sukupuolijakauma, miesten osuus punaisella ja naisten sinisellä.

Suurin osa viljelypositiivisista näytteistä oli yli 70 vuotiailta potilailta eli 71,1 % (1 599 kpl). Positiivisten viljelytulosten keskiarvo ikä oli 73 vuotta. Alle 3-vuotiaiden näytteitä oli vain 17 kappaletta eli 0,76 %. Pienten lasten ulosteessa voi olla enemmän *C.difficile* -bakteeria normaalifloorassa kuin aikuisella. Tämä täytyy ottaa huomioon näytteitä arvioitaessa. Näistä 17 näytteestä vain yksi on ollut PCR:n mukaan hypervirulenttikanta.

Taulukko 3. Tulokset ja näytteiden määrä ristiintaulukoimalla, punaisella oikeat positiiviset, vihreällä väärät positiiviset, sinisellä väärät negatiiviset ja oranssilla oikeat negatiiviset tulokset. Alariveillä tulosten yhteismäärä ja prosenttiosuudet.

	Viljely ja PCR (vertailumenetelmä)					
		PCR toksiinipositiivinen tulos	PCR toksiininegatiivinen tulos	viljelyn negatiivinen tulos	Yhteensä	%
Suoratoksiininosoitus/Vidas (tutkittava menetelmä)	positiivinen tulos	1461	5	180	1646	14,9
	negatiivinen tulos	460	84	8411	8955	80,9
	raja-arvo	232	8	232	472	4,3
	yhteensä	2153	97	8823	11073	100
	%	19,4	0,9	79,7	100,0	

Taulukko 4. Herkkyys, spesifisyys, positiivinen ja negatiivinen ennustearvo ilman raja-arvoja.

Ei raja-arvoja	
herkkyys	76,05 %
spesifisyys	97,87 %
PPV	88,76 %
NPV	94,86 %

11 073 näytteestä viljelypositiivisia oli 2 250 (20,3 %) kappaletta, joista PCR oli antanut toksiininegatiivisen tuloksen 97 viljelmälle eli 4,3 %:lle. 97 kappaletta ovat olleet siis toksiinia tuottamattomia kantoja. Nämä eivät siis aiheuta tautia ja voivat näin ollen kuulua potilaan suoliston normaaliflooraan.

Vidas antaa raja-arvoina tulokset, joiden fluoresenssiarvo on välillä 0,13 - 0,37. Taulukoissa on eritelty tulokset, jotta nähdään miten raja-arvot vaikuttavat spesifisyyteen, herkkyYTEEN ja ennustearvoihin. Koska raja-arvo voi olla yhtä lähellä positiivista löydöstä kuin negatiivistakin, raja-arvot voivat vaikuttaa menetelmän luotettavuuteen. Jos raja-arvoja ei oteta huomioon tuloksissa, herkkyudeksi saadaan 76,05 % ja spesifisyydeksi 97,87 % sekä positiivinen ennustearvo on 88,76 % ja negatiivinen ennustearvo on 94,86 %.

Taulukko 5. Herkkyys, spesifisyys, positiivinen ja negatiivinen ennustearvo mukaan lukien raja-arvot negatiivisina tuloksina.

Raja-arvot mukana olettaen ne negatiivisiksi	
herkkyys	76,05 %
spesifisyys	97,98 %
PPV	88,76 %
NPV	95,12 %

Jos raja-arvot tulkitaan negatiivisiksi, pysyvät herkkyys ja positiivinen ennustearvo samoina. Spesifisyys kasvaa 97,98 %:iin ja negatiivinen ennustearvo 95,12 %:iin.

Taulukko 6. Herkkyys, spesifisyys, positiivinen ja negatiivinen ennustearvo mukaan lukien raja-arvot positiivisina tuloksina.

Raja-arvot mukana olettaen ne positiivisiksi	
herkkyys	80,78 %
spesifisyys	97,87 %
PPV	91,27 %
NPV	94,86 %

Jos raja-arvot tulkitaan positiivisiksi, nousevat herkkyys 80,79 %:iin, spesifisyys 97,87 %:iin ja positiivinen ennustearvo 91,27 %:iin. Negatiivinen ennustearvo pysyy samana jos raja-arvoja ei oteta huomioon tuloksiin.

Alhainen negatiivinen ennustearvo johtaa riittämättömään hoitoon ja taudin leviämiseen, koska mahdolliset taudinkantajat jäävät huomioimatta.

7 LOPPUPÄÄTELMÄT

Clostridium difficile aiheuttaa antibioottiripulitautia eli CDI:ta ja se voi johtaa pseudomembranoottiseen koliittiin ja jopa kuolemaan. Entsyymi-immunomenetelmiä käytetään laajalti yleisesti laboratoriodiagnostiikassa *Clostridium difficile* –bakteerin havainnoimiseksi potilasnäytteestä. EIA-testeillä on kuitenkin huono herkkyys, jolloin mahdolliset positiiviset näytteet jäävät huomaamatta. Opinnäytetyössä tutkittiin TyksLab:n käyttämää EIA-menetelmään perustuvaa diagnosointia UtuLab:n viljelyyn ja PCR-menetelmään.

Toksiinia mittaavien menetelmien herkkyys vaihtelee tutkimusten mukaan 69 – 99 % ja spesifisyys 93 – 100 %. Opinnäytetyön tulokset mukailivat näitä tuloksia. Tärkein tutkimustulos on herkkyys, koska se kertoo miten luotettava menetelmä on eli saadaanko kaikki tautia kantavat diagnosoitua. (22)

Vidas-menetelmälle on saatu herkkyudeksi 89,9 % ja spesifisyydeksi 96,7 % tutkimuksen mukaan. Opinnäytetyön tulosten mukaan herkkyys on alempi 76,05 – 80,78 % ja spesifisyys pysyy melkein samanlaisena 97,87 – 97,98 %. (23)

Vidas soveltuu nopeaa taudin diagnostiikkaan, jolloin tarvittava hoito voidaan aloittaa mahdollisimman nopeasti potilailla. Vidas-menetelmän ohella tarvitaan myös referenssimenetelmä, jolla voidaan varmistaa näytteiden tulokset. Koska Vidas ei anna lukuarvoa tuloksille, voivat jotkin raja-arvo tapaukset kuitenkin olla hoitoa vaativia. PCR-menetelmällä havaitaan myös hypervirulentit kannat sekä binääritoksiinia tuottavat kannat. Lisäksi huomataan lisääntykö pelkkää toksiini B:tä tuottavat kannat, koska Vidas ei erittele vastaukseen näytteestä mitatun toksiinin tyyppiä.

Tuloksiin vaikuttavat näytteiden käsittely ja laatu. Huonolaatuinen näyte voi antaa virhetuloksen. Tällaisia virhelähteitä ovat muun muassa liian vähäinen näytemäärä tai vääränlainen ulosteen laatu esimerkiksi liian kiinteä uloste.

Työn haastavana puolena oli aineistoin kerääminen, koska TyksLab:n tulokset olivat saatavana vain tulosteena. Tulokset käytiin läpi käsin. Kun positiiviset näytteet oli käyty läpi, huomattiin, että TyksLab:n negatiivisia VIDAS-tuloksia ei ollut lainkaan ja ne piti käydä vielä läpi. Utulab:n tulokset oli kerätty Excel-tilukkuun aikajärjestyksessä. Dataa oli paljon ja tulostaminen ei olisi ollut kannattavaa, joten vertailu tapahtui Excel-tilukkoa selaamalla.

Opinnäytetyö oli osa posteria ja väitöskirjaa. Poster i julkaistiin Milanossa toukokuussa 2011 ECCMID-kongressissa (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). ECCMID on ESCMID järjestämä (European society of Clinical Microbiology and Infectious diseases). (24)

Lähteet

1. Utulab:n viralliset kotisivut. [Online viitattu 31.7.2011] Saatavilla: <http://www.med.utu.fi/ylab/>.
2. TyksLab:n viralliset kotisivut. [Online viitattu 31.7.2011] Saatavilla: <http://www.tykslab.fi/fi/>.
3. Rautio, M. 2010 Bakteerit ja niiden aiheuttamat taudit: *Clostridium*-lajit. Teoksessa: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1 Mikrobiologia. ss.233-238. Kustannus Oy Duodecim.
4. Curry, S. (2010) *Clostridium difficile*. Clin lab med 30: 329-342.
5. Rupnik, M., Wilcox, M. & Gerding, D. (2009) *Clostridium difficile* infection: new development in epidemiology and pathogenesis. Nature reviews: Microbiology, volume 7, July 2009: 526-536.
6. Hedge, D., Strain, J., Heins, J. & Farver, D. (2008) New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI). Therapeutics and clinical risk management 2008: 4(5) 949-964.
7. Suwantrarat, N. & Bobak, D. (2011) Current status of nonantibiotic and adjunct therapies for *Clostridium difficile* infection. Curr Infect Dis Rep 13: 21-27.
8. Louie, T.J., Miller, M.A., Mullane, K.M., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Gorbach, S., Sears, P. & Shue, Y-K. (2011) Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium difficile* Infection. The New England Journal of Medicine, February 3. 364: 422-431.
9. Lyytikäinen, O., Turunen, H., Rasinperä, M., Könönen, E., Vuento, R. & Keskimäki, I. (2007) Vanhusten *Clostridium difficile* –infektiot ovat lisääntyneet. Suomen Lääkärilehti 32/2007 vsk 62: 2753-2757.
10. Sairaalainfektio-ohjelma (SIRO) (2008) *Clostridium difficile* –infektiot, seurantakäsikirja. Kansanterveyskeskuksen julkaisuja. C3/2008.
11. Jalava, J., Eerola, E., Lindolm, L., Meurman, O. & Virolainen-Julkunen, A. (2009) *Clostridium difficile*en toteaminen ja kantojen tyypitys. Moodi 2/2009: 246-251.
12. Deneve C. (2009) Virulence determinants of *C. difficile*. International journal of antimicrobial agents 33.2009: 524-528.
13. Hamm, E.E., Voth, D.E. & Ballard, J.D. (2006) Identification of *Clostridium difficile* toxin B cardiotoxicity using a zebrafish embryo model of intoxication. PNAS September 19, 2006 no. 38: 14176-14181.
14. Könönen, E., Rasinperä, M., Virolainen, A., Mentula, S. & Lyytikäinen, O. (2009) Diagnostic trends in *Clostridium difficile* detection in Finnish microbiology laboratories. Anaerobe 15/2009: 261-265.
15. Planche, T., Aghaizu, A., Holliman, R., Riley, P., Poloniecki, J., Breathnack, A. & Krishna, S. (2008) Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. Lancet Infect Dis 2008; 8: 777-784.
16. Carroll, K.C. (2011) Clinical microbiology, Tests for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: The next generation. Anaerobe, 2011:1-5.
17. Eastwood, K., Else, P., Charlett, A. & Wilcox, M. (2009) Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile tcdB*, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxinigenic culture methods. Journal of clinical microbiology, Oct. 2009:3211-3217.

18. *Clostridium difficile*, PaLoc- ja CDT-lokusten virulenssitekijöiden määrittäminen multiplex-PCR-menetelmällä. Työohje.
19. Biomerieux, VIDAS *C. difficile* A & B, kitin käyttöohje. 2008/02.
20. Biomerieux-tuotteet (2012) [Online, viitattu 26.2.2012]. Saatavilla: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/home> > lab professionals > immunodiagnosics > automated immunoanalyzers > VIDAS > simplicity makes the difference.
21. Lindholm, L. (2011). Kuva 7. *Clostridium difficile* – pesäkkeitä CCFA-maljalla. Kuva 8. *Clostridium difficile* – pesäkkeitä FAA-maljalla.
22. Crobach, M.J.T., Dekkers, O.M., Wilcox, M.H. & Kuijper, E.J. (2009) European society of clinical microbiology and infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* –infection (CDI). Clinical Microbiology and Infection, volume 15 number 12, December 2009: 1053-1066.
23. Shin, B-M., Lee, E-J., Kuak, E-Y. & Yoo, S. (2009) Comparion of VIDAS CDAB and CDA immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* in a *tcdA*⁻ *tcdB*⁺ *C. difficile* prevalent area. Anaerobe 15, 2009: 266-269.
24. Lindholm, L., Kalluinen, M., Eerola, E., Meurman, O., Virolainen, A. & Jalava, J. (2011) Correlation between *Clostridium difficile* toxin genes and the direct toxin detection assay results. 21th Eur.Cong. Clin.Microbiol. Infect. Dis. P1986.

CCFA-malja

Clostridium difficile Agar Base

Tislattu vesi

Hemin: Hemin, 3 N NaOH, tislattu vesi. Suodatettu imulla.

Neutraalipuna (1% etanoliliuos): Neutralrot, 94 % etanoli. Steriloitiin ja annettiin lämpötilan laskea 46 °C:een, jolloin joukkoon lisättiin D-cycloserine-liuos (D-cycloserine ja steriloitu vesi), munaluos (kananmuna desinfioitiin 70 % etanolilla pyyhkien ja annettiin kuivua, kuori rikottiin ja keltuaiseen lisättiin steriloitua 0,9 % NaCl:a) ja cefoxitin (Cefoxitin Sodium salt ja steriloitu tislattu vesi).

10 N NaOH

Reagenssit liuotettiin ja suodatettiin 0,22 µm ruiskun läpi ja jaettiin maljoille.

FAA-malja

FAA-maljan pohja koostuu peptonista, glukoosista, agarista ja tärkkelyksestä. Pohjan lisätään lampaan verta, K-vitamiinia ja hemiinia, jotka auttavat anaerobeja kasvamaan.

Multiplex-PCR-alukkeet

Geeni	Alukkeen nimi	sekvenssi (5'-3')	PCR (bp)
cdu2	cdu-2-II-f	TAAACGATTTGAAGAAAGTGGG	691
cdu2	cdu-2-II-r	AAAATTACAGCTCCAATTCCTG	
tcdA	tcdA-605-for	TTTAAGTGGTCCAGGAGCTTAT	605
tcdA	tcdA-605-rev	ATCTAGCAAATTCGCTTGTGTT	
tcdB	tcdB_co1_P1-f	AAATGGCAAATGTGGGATTTTCG	294
tcdB	tcdB_co1_P2-r	CATTTATTTGMCCTCCAATCCA	
cdtB	ctdB-261-for	TGGGAAGACGAAGATTTGGATA	239
cdtB	cdtBrev	AACGGATCTCTTGCTTCAGTC	
tcdC	tcdC-lyh-f2	CAGGTGTTCTAGMTAATTGGTC	148
tcdC	tcsC-lyh-r	GCTATTGAAGCTGAAAATCAAC	

VIDAS CDAB-stripin kaivojen sisältö

kaivo	reagenssit
1	näytekaivo
2-3-4	pesuliuos 600 µl: TRIS-puskuroitu suolaliuos 0,05 mol/l (pH 7,2), detergentti ja säilöntäaineet
5	konjukaatti: liuotettu hiiren monoklonaalinen vasta-aine toks A:lle konjukoituna biotiinilla ja hiiren monoklonaalinen vasta-aine toks B:lle konjukoituna biotiinilla ja säilöntäaineilla
6	merkkiaine: streptavidini merkattu alkaalisella fosfataasilla + TRIS-puskuroitu suolaliuos 0,05 mol/l (pH 6,0) + säilöntäaineet (400 µl)
7-8-9	pesuliuos 600 µl: TRIS-puskuroitu suolaliuos 0,05 mol/l (pH 7,2), detergentti ja säilöntäaineet
10	substraattikyvetti: 4-metyyli-umbelliferyylifosfaatti (0,6 mmol/l) + dietanoliamiini DEA (0,62 mol/l tai 6,6 %) pH 9,2 + 1 g/l natriumatsidi (300 µl)